

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-178698

(43)Date of publication of application : 28.06.1994

(51)Int.Cl.

C12Q 1/32

C12Q 1/42

(21)Application number : 04-331922

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 11.12.1992

(72)Inventor : YAMAMOTO KAZUMI

SOGABE YUKIHIRO

AISUI SHIGENORI

## (54) METHOD FOR MEASURING PHOSPHORIC ACID AND REAGENT THEREFOR

## (57)Abstract:

PURPOSE: To prepare the reagent having excellent solution stability and used for measuring phosphoric acid.

CONSTITUTION: The method for measuring phosphoric acid and the reagent for measuring the phosphoric acid are characterized by measuring the phosphoric acid in a specimen with a pyruvic acid dehydrogenase which catalyzes the below-mentioned reaction and is stable up to 50° C at 6.3 for 15hr. The reaction equation: pyruvic acid + electron receptor → acetylphosphoric acid + CO<sub>2</sub> + reduced electron receptor. And the method and reagent for measuring a substrate in a phosphoric acid-releasing system, such as ATP, pyrophosphoric acid or a phosphoric acid ester, and an enzyme catalyzing a phosphoric acid-forming reaction, such as ATPase, pyrophosphatase or phosphatase, are characterized by using the pyruvic acid dehydrogenase.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(4) [JP-A-H6-178698]

Paragraph [0023]

Examples of the detection system of the reduced electron acceptor include e.g., the following conjugated systems:

(1) Electron acceptor

Phenazine methosulfate (PMS),

1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (1-mPMS),

9-Dimethylaminobenzo- $\alpha$ -phenazoxonium (Meldola's blue),

(2) Formazan based pigment

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H  
tetrazolium (MTT)

Neotetrazolium blue

Nitrotetrazolium blue (NTB)

Tetrazolium blue (TB)

Tetranitrotetrazolium blue (TNTB)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-178698

(43)公開日 平成6年(1994)6月28日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/32	6807-4B		
	1/42	6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-331922	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号
(22)出願日	平成 4 年(1992)12月11日	(72)発明者	山本 和巳 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	曾我部 行博 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	愛水 重典 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(54)【発明の名称】 リン酸の測定法およびその試薬

(57)【要約】

【目的】 優れた溶液安定性を有するリン酸測定用試薬を提供する。

【構成】 下記反応を触媒し、かつpH6.3、15分間処理で50℃まで安定であるピルビン酸デヒドロゲナーゼを用いて、試料中のリン酸を測定することを特徴とするリン酸の測定法およびリン酸測定用試薬。

反応式 : ピルビン酸+リン酸+電子受容体 →アセチルリン酸+CO<sub>2</sub> +還元型電子受容体

および上記ピルビン酸デヒドロゲナーゼを用いて、リン酸を遊離する系における基質、例えばATP、ピロリン酸、リン酸モノエステルなど、及びリン酸形成反応を触媒する酵素、例えばATPase、ピロホスファターゼ、ホスファターゼなどの測定法および測定用試薬。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中のリン酸に下記反応を触媒し、かつ pH6.3、15 分間処理で 50℃ まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸および電子受容体を作用させ、生成するアセチルリン酸、二酸化炭素または還元型電子受容体あるいは消費する電子受容体またはビルビン酸を測定することにより、試料中のリン酸を測定することを特徴とするリン酸の測定法。

反応式：ビルビン酸 + リン酸 + 電子受容体 → アセチルリン酸 + CO<sub>2</sub> + 還元型電子受容体

【請求項 2】 試料中の ATP に ATPase を作用させ、生成したリン酸に下記反応を触媒し、かつ pH6.3、15 分間処理で 50℃ まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼを作用させ、生成するアセチルリン酸、二酸化炭素または還元型電子伝達体あるいは消費する電子受容体またはビルビン酸を測定することにより、試料中の ATP を測定することを特徴とする ATP の測定法。

反応式：ビルビン酸 + リン酸 + 電子受容体 → アセチルリン酸 + CO<sub>2</sub> + 還元型電子受容体

【請求項 3】 下記反応を触媒し、且つ pH6.3、15 分間処理で 50℃ まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸および電子受容体を含有することを特徴とするリン酸測定用試薬。

反応式：ビルビン酸 + リン酸 + 電子受容体 → アセチルリン酸 + CO<sub>2</sub> + 還元型電子受容体

【請求項 4】 ATPase、下記反応を触媒し、且つ pH6.3、15 分間処理で 50℃ まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸および電子受容体を含有することを特徴とする ATP 測定用試薬。

反応式：ビルビン酸 + リン酸 + 電子受容体 → アセチルリン酸 + CO<sub>2</sub> + 還元型電子受容体

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、リン酸またはリン酸を遊離する系を有してなる試料中のリン酸の測定法およびその試薬に関するものである。また本発明によれば、リン酸の直接測定ばかりではなく、リン酸を遊離する系における基質、例えば ATP、ピロリン酸、リン酸モノエステルなど、及びリン酸形成反応を触媒する酵素、例えば ATPase、ピロホスファターゼ、ホスファターゼなどの測定にも利用することができる。

## 【0002】

【従来の技術】従来、血清や尿中のリン酸の比色定量はプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (EC2.4.2.1)、キサンチンオキシダーゼ (EC1.2.3.2) およびペルオキシダーゼ (EC1.11.1.7) を共役させる測定法やビルビン酸オキシダーゼ (EC1.2.3.3) およびペルオキシダーゼ (EC1.11.1.7) を共役させる測定法 (特公昭 61-40400 号公報) が用いられてきたが、いずれも酵素共役系で複数の酵素が必要であり、また酵素の耐熱性も充分ではなかった。更に使

用する酵素がオキシダーゼ系であることより溶存酵素等の問題から、高濃度のリン酸存在下では検量線が曲がってしまい、高濃度のリン酸測定やドライ・ケミストリーには不適当であった。また従来より溶存酵素の影響を受けないビルビン酸デヒドロゲナーゼとしては、いわゆる Pyruvate Dehydrogenase complex を形成している Pyruvate : Lipoamide oxidoreductase (EC1.2.4.1)、Pyruvate : Ferricytochrome b<sub>1</sub> oxidoreductase (EC1.2.2.2) 及び Pyruvate : Ferredoxin oxidoreductase (EC1.2.7.1) が知られているが (酵素ハンドブック、丸尾文治、田宮信雄監修、発行所：朝倉書店)、従来知られている Pyruvate Dehydrogenase complex の形成反応には無機リン酸は関与しないため、これらの酵素をリン酸の測定には使用できない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは上記の背景を踏まえて、熱安定性に優れ、溶存酵素の影響を受けず、更により高濃度のリン酸を測定出来る、より実用的なリン酸測定試薬を見い出そうとした。

## 【0004】

【問題点を解決するための手段】本発明者らはラクトバチルス属に属する微生物から、ビルビン酸の酸化的リン酸化反応を触媒し、熱安定性に優れたビルビン酸デヒドロゲナーゼを見だし、既に特許出願した (特開平 1-37300 号)。更に本発明者らはこのビルビン酸デヒドロゲナーゼが酵素反応にリン酸の存在を必須要件とするものであって、且つリン酸の量と酵素反応はその関係において定量的な反応を示すことを新たに発見し、有効に高濃度リン酸まで測定し得ることを見出した。さらに、リン酸を生成する酵素反応系の酵素活性の測定、リン酸を生成する酵素反応系の基質の定量を成し得ることを見出し本発明に到達した。

【0005】すなわち本発明は試料中のリン酸に下記反応を触媒し、かつ pH6.3、15 分間処理で 50℃ まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸および電子受容体を作用させ、生成するアセチルリン酸、二酸化炭素または還元型電子受容体あるいは消費する電子受容体またはビルビン酸を測定することにより、試料中のリン酸を測定することを特徴とするリン酸の測定法である。

反応式：ビルビン酸 + リン酸 + 電子受容体 → アセチルリン酸 + CO<sub>2</sub> + 還元型電子受容体

【0006】また本発明は試料中の ATP に ATPase を作用させ、生成したリン酸に下記反応を触媒し、かつ pH6.3、15 分間処理で 50℃ まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼを作用させ、生成するアセチルリン酸、二酸化炭素または還元型電子伝達体あるいは消費する電子受容体またはビルビン酸を測定することにより、試料中の ATP を測定することを特徴とする ATP の測定法である。

【0007】さらに本発明は下記反応を触媒し、且つpH 6.3、15分間処理で50℃まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸および電子受容体を含むことを特徴とするリン酸測定用試薬である。

反応式：ビルビン酸+リン酸+電子受容体 → アセチルリン酸+CO<sub>2</sub>+還元型電子受容体

【0008】また本発明はATPase、下記反応を触媒し、且つpH6.3、15分間処理で50℃まで安定であるビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸および電子受容体を含むことを特徴とするATP測定用試薬である。

反応式：ビルビン酸+リン酸+電子受容体 → アセチルリン酸+CO<sub>2</sub>+還元型電子受容体

【0009】本発明は試料中の成分、特にリン酸を測定するものであるが、試料としてはヒト血清、食品などに限られない。また本発明ではリン酸を直接に測定することにより、試料中のリン酸を形成する物質、例えばATP、リン酸モノエステルなど、またはリン酸形成反応を触媒する酵素、例えばATPase、ホスファターゼなどの体液中の成分測定も可能とする。

【0010】本発明に使用されるビルビン酸デヒドロゲナーゼとしては、ビルビン酸の酸化的リン酸反応を触媒し、pH6.3、15分間処理で50℃まで安定な熱安定性に優れたビルビン酸デヒドロゲナーゼであればよく、好ましくは、ラクトバチルス・デルブリッチィ・サブスピーシズ・ラクティスJCM 1063、JCM1248、ラクトバチルス・デルブリッチィ・IF03202、IF03534、ラクトバチルス・サリバリウム・サブスピーシズ・サリバリウムJCM 1231の生産するビルビン酸デヒドロゲナーゼが挙げられる。しかしこれらの菌に限らず、ラクトバチルス属に属し、熱安定性に優れたビルビン酸デヒドロゲナーゼを生産する菌は、全て本発明において使用することができる。

【0011】本発明に使用する熱安定性に優れたビルビン酸デヒドロゲナーゼ生産菌は酵素を生産する通常の方法で培養する。使用する培地組成としては、使用菌株が資化する炭素源、窒素源、無機物、その他必要な栄養素を適量含有するものであれば、合成培地、天然培地いずれも使用できる。例えば炭素源としてはグルコース、シュクロース、デキストリン、ビルビン酸、糖蜜などが

使用される。窒素源としては、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物などの窒素含有天然物や、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、グルタミン酸などのアミノ酸など、無機あるいは有機の窒素化合物が使用される。培養は、通常振盪培養あるいは通気攪拌培養で行う。培養温度は20℃～50℃の範囲、好ましくは37℃付近、培養pHは5～8の範囲、好ましくはpH6～7に制御するのが良い。これら以外の条件下でも使用する菌株が生育すれば実施できる。培養期間は通常1～4日間で生育し、菌体内にビルビン酸デヒドロゲナーゼが生成蓄積される。

【0012】本発明に使用する酵素の精製法は一般に使用される精製法を用いればよい。例えば抽出法には超音波破碎、ガラスビーズを用いる機械的な破碎、フレンチプレス、界面活性剤など、いずれを用いてもよい。さらに精製法については公知の硫酸や芒硝などの塩析法、塩化マグネシウムや塩化カルシウムなどの金属凝集法、プロタミンやポリエチレンジアミンなどの凝集さらにはDEAE（ジエチルアミノエチル）セファロース、CM（カルボキシメチル）セファロースなどのイオン交換体クロマト法などにより精製することができる。

【0013】次に本発明に使用する酵素の一例である、ラクトバチルス属に属する微生物から得られた熱安定性に優れたビルビン酸デヒドロゲナーゼの理化学的性質について述べる。

#### (1) 作用

ビルビン酸+リン酸+電子受容体 → アセチルリン酸+CO<sub>2</sub>+還元型電子受容体

#### (2) 基質特異性

(a) オキサロ酢酸、DL-乳酸、酢酸またはα-ケトグルタル酸には反応せず、ビルビン酸に特異的である。

(b) 電子伝達系に酸素のみを用いた場合、及び下記表1に示す電子受容体を加えた場合のオキシダーゼとしての酵素活性を示した。表示は酸素のみの活性を100とした相対活性を示した。また同様の反応を示すビルビン酸オキシダーゼ〔Fed.Proc.13 巻734～738(1954)〕と種々の電子伝達系において、その性質を比較した結果は次の通りである。

#### 【0014】

#### 【表1】

電子伝達系	本発明 活性値	公知のピルビン酸 オキシダーゼ文献値
酸素	100	100
1-ナキシPMS	140	—
ナレンプル	155	64
フェリシアイド	122	55
DCPIP	170	—

上記結果、電子伝達系として電子受容体を添加するとオキシダーゼ活性が消失することにより、本酵素は電子伝達系として酸素よりも他の電子受容体に作用しやすい。

#### 【0015】(3) 至適pH

ピルビン酸デヒドロゲナーゼの反応pHの影響を求めた。緩衝液は50mM K-リン酸緩衝液を用いて行なった。各pHでのピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性の測定結果は図1に示す通りであり、至適pHは6.2～6.3付近である。

#### (4) 安定pH

緩衝液には50mM酢酸緩衝液(pH3～6)、50mM K-リン酸緩衝液(pH5.5～8)、50mM Tris-HCl 緩衝液を用い、25℃、20時間保温して、その残存活性を測定した。その結果は図2に示す通り、安定pHは5～8付近である。

#### (5) 至適温度

各温度における酵素活性を測定した。その結果は図3に示す通り、至適温度は55℃付近である。

#### (6) 熱安定性

ピルビン酸デヒドロゲナーゼを50mM K-リン酸緩衝液、pH6.3 で40～60℃で15分間加熱した後、残存活性を測定した。その結果は図4に示す通り、50℃まで安定である。

#### (7) 物質的影響

(a) 酵素活性測定法にて示す反応系より、表2の物質を除去した場合の酵素活性を次表に相対活性として示す。なお、リン酸除去の場合は緩衝液として50mM酢酸緩衝液pH6.3を用いた。

【0016】

【表2】

除去物質	相対活性(%)
未処理	100
TPP	0
FAD	85.7
リン酸	0
Mg <sup>2+</sup>	0

【0017】以上の結果より、上記酵素はコファクターとしてTPP（チアミンピロホスフェート）、FAD、Mg<sup>2+</sup>が必要であり、基質としてリン酸が必要なことが判明する。

(b) 酵素活性測定法にて示す反応系のMgSO<sub>4</sub>の代わりに、次に示す種々の金属を用いて酵素活性を測定した。各種金属の反応液中での濃度は10mMであり、さらに表示はMgSO<sub>4</sub>のときの活性を100として相対活性で示した。

【0018】

【表3】

添加物質	相対活性 (%)
MgSO <sub>4</sub>	100
MnCl <sub>2</sub>	3.0
CoCl <sub>2</sub>	114.4
CaCl <sub>2</sub>	108.9
ZnSO <sub>4</sub>	66.7
BaAc <sub>2</sub>	0
FeCl <sub>2</sub>	0
NiCl <sub>2</sub>	88.3
CuSO <sub>2</sub>	0

その結果、Mg<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> およびNi<sup>2+</sup> により酵素活性が発現する。

【0019】次に本発明のピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性測定法を示す。

0.15M K-リン酸緩衝液 pH6.3	10ml
3mM TPP	2ml
0.15mM FAD・Na <sub>2</sub>	2ml
15mM EDTA・Na <sub>2</sub>	2ml
0.15mM MgSO <sub>4</sub>	2ml
1mM 1-メトキシPMS-10mM NTB	3ml
10% Triton X-100	1.5ml
蒸留水	2.5ml

上記反応液を調整した後、2.5ml を試験管に分取し、0.3Mピルビン酸カリウム水溶液を0.5ml 加えて、37℃で5分間予備加温する。酵素溶液0.1ml を添加し、ゆるやかに混和後、水を対照に37℃に制御された分光光度計で570nm における1分間当りの吸光度変化を求める(ΔODtest)。盲検は、酵素溶液の代わりに酵素希釈液50mM K-リン酸緩衝液、pH6.3 を0.1ml 加え、上記同様に操作を行って1分間当りの吸光度変化を求める(ΔODblank)。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性の表示は、上記条件で1分間あたり1/2 マイクロモルのジフォルマザンを生成する酵素単位を1単位(U)とする。

【0020】本発明で使用する熱安定性に優れたピルビン酸デヒドロゲナーゼの一例は、次の方法により製造した。

#### 1. 培養

肉エキス0.5%、ポリペプトン2%、酵母エキス1%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・3H<sub>2</sub>O 1%、MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.02%を含む培地(pH6.8) 90mlを500ml 容坂ロフラスコに移し、121℃、15分間オートク

レーブを行った。冷却した後、別殺菌して20%ピルビン酸ナトリウム水溶液(pH5.0) を無菌的に10ml添加した。種菌としてラクトバチルス・デルブリッチィ・IFO 3202を同培地に一白金耳接種し、37℃で24時間振盪培養し種培養液とした。次に同培地5.4Lを10L、ジャーファーマターに移し、121℃で15分間オートクレーブを行い、放冷後、別殺菌した20%ピルビン酸水溶液を無菌的に600ml 添加した。これに種培養液100ml を移し、300rpm、通気量 2L/分、37℃で24時間培養した。培養終了時のピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性は、0.35U/mlであった。

#### 2. 精製

培養液6Lを遠心分離にて集菌し、50mM K-リン酸緩衝液 pH7.0、100mlにて懸濁した。超音波破砕機(海上電気製19KHZ)にて15分間処理し、遠心分離してその上清液を得た。上清液を、50mM K-リン酸緩衝液、pH7.0 にて平衡化したDEAE-セファロースCL-6B(ファルマシア製)カラムクロマトグラフィーに供し、0~0.5MNaCl 溶出画分にピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性を得た。溶出液を限外濾過機にて濃縮した後、50mM MES緩衝液 pH 6.3 にて平衡化したセファデックスG-200(ファルマシア製)にてゲル濾過を行った。その結果、840Uのピルビン酸デヒドロゲナーゼが得られた。

【0021】本発明では試料に、上記ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸及び電子受容体を含有する試薬を添加して、還元型電子受容体、二酸化炭素又はアセチルリン酸の生成量を測定するか、あるいは酸化型電子受容体またはピルビン酸の消費量を測定することにより、試料中のリン酸の量を知ることができる。特に本発明の熱安定性に優れたピルビン酸デヒドロゲナーゼを含有する反応系においては、リン酸との酵素反応性を良好に行

わせるため、ビルビン酸デヒドロゲナーゼと共に、ATP、ビルビン酸、電子受容体及びマグネシウムイオン、コバルトイオン、カルシウムイオン、ニッケルイオン、亜鉛イオンのうち少なくとも1種の金属イオンおよび必要によりFADを用いればよく、さらにまたこの反応による生成物である還元型電子受容体の比色検出系を用いる場合は、必要によりホルマザン系色素を適宜選択して共役させればよい。

【0022】本発明では酵素の使用量としては酵素反応が十分に進行する量であればよく、また試料中のビルビン酸の含量、酵素反応の温度、時間などにより適宜変更されるものであるが、例えば本発明試薬は熱安定性に優れたビルビン酸デヒドロゲナーゼ約 0.01 ~ 10U/ml、ビルビン酸約 10 ~ 500  $\mu$ M、FAD 約 1 ~ 20  $\mu$ M、TPP 約 0.1 ~ 0.5mM、金属イオン約 1 ~ 50mM、電子受容体約 0.01 ~ 1mM、緩衝液 pH5~7.5 並びに還元型電子受容体としてホルマザン系色素約 0.1~10mM を含有する。リン酸を形成する物質又はリン酸形成反応を触媒する酵素を測定するには、本発明の試薬と従来公知のリン酸へ誘導する試薬を組み合わせる。

【0023】還元型電子受容体の検出系としては、例えば次のような共役系が挙げられる。

① 電子受容体

フェナジンメトサルフェート(PMS)

1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート(1-mPMS)

9-ジメチルアミノベンゾ- $\alpha$ -フェナゾクソニウム(メルトラブルー)

② ホルマザン系色素

3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム(MTT)

ネオテトラゾリウムブルー

ニトロテトラゾリウムブルー(NTB)

テトラゾリウムブルー(TB)

テトラニトロテトラゾリウムブルー(TNTB)

【0024】本発明において、試料中のリン酸を遊離する系における基質、例えばATPを測定するには、ATPase、上記ビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸及び電子受容体を含有する試薬を添加して、還元型電子受容体、二酸化炭素又はアセチルリン酸の生成量を測定するか、あるいは酸化型電子受容体またはビルビン酸の消費量を測定することにより、試料中のATPの量を知ることができる。またピロリン酸を測定するには、ピロホスファターゼ、上記ビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸及び電子受容体を含有する試薬を添加して、還元型電子受容体、二酸化炭素又はアセチルリン酸の生成量を測定するか、あるいは酸化型電子受容体またはビルビン酸の消費量を測定することにより、試料中のピロリン酸の量を知ることができる。さらにリン酸モノエステルなどを測定するには、エステラーゼ、上記ビルビン

酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸及び電子受容体を含有する試薬を添加して、還元型電子受容体、二酸化炭素又はアセチルリン酸の生成量を測定するか、あるいは酸化型電子受容体またはビルビン酸の消費量を測定することにより、試料中のリン酸モノエステルの量を知ることができる。

【0025】本発明において、試料中のリン酸形成反応を触媒する酵素、例えばATPaseを測定するには、ATP、上記ビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸及び電子受容体を含有する試薬を添加して、還元型電子受容体、二酸化炭素又はアセチルリン酸の生成量を測定するか、あるいは酸化型電子受容体またはビルビン酸の消費量を測定することにより、試料中のATPaseの量を知ることができる。またピロホスファターゼを測定するには、ピロリン酸、上記ビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸及び電子受容体を含有する試薬を添加して、還元型電子受容体、二酸化炭素又はアセチルリン酸の生成量を測定するか、あるいは酸化型電子受容体またはビルビン酸の消費量を測定することにより、試料中のピロホスファターゼの量を知ることができる。さらにホスファターゼを測定するには、リン酸モノエステル、上記ビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸および電子受容体を含有する試薬を添加して、還元型電子受容体、二酸化炭素又はアセチルリン酸の生成量を測定するか、あるいは酸化型電子受容体またはビルビン酸の消費量を測定することにより試料中のホスファターゼを測定することができる。

【0026】

【実施例】以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例 1

MES緩衝液 pH6.3	50 mM
FAD · Na <sub>2</sub>	10 $\mu$ M
TPP	0.2 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
1-mPMS	0.1 mM
NTB	1.0 mM
Triton X-100	0.5 %
ビルビン酸カリウム	50 mM
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ	0.1 U/ml

上記の組成よりなる反応液3.0ml を分取し、37℃で約5分間予備加温し、これにリン酸1カリウム水溶液(6~30mM)0.1mlを添加した後、37℃、5分間反応させ、570nmにおける吸光度変化を記録し、その初期直線部分より1分間当りの吸光度変化を測定した。その結果は図5に示す通り反応液中のリン酸1カリウム濃度が1mMの高濃度まで極めて良好な定量曲線が得られた。

【0027】実施例 2

MES 緩衝液 pH6.3	50 mM
FAD · Na <sub>2</sub>	10 $\mu$ M



TPP	0.2 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
1-mPMS	0.1 mM
NTB	1.0 mM
Triton X-100	0.5 %
ビルビン酸カリウム	50 mM
ATPase	1 U/ml
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ	0.1 U/ml

上記の組成よりなる反応液3.0ml を分取し、37℃で約5分間予備加温し、これにATP水溶液(6~30mM) 0.1ml を添加した後、37℃,5分間反応させ、570nm における吸光度変化を記録し、その初期直線部分より1分間当りの吸光度変化を測定した。その結果は図6に示す通り反応液中のATP濃度が1mM の高濃度まで極めて良好な定量曲線が得られた。

#### 【0028】実施例3

MES緩衝液 pH6.3	50 mM
FAD·Na <sub>2</sub>	10 μM
TPP	0.2 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
1-mPMS	0.1 mM
NTB	10 mM
Triton X-100	0.5 %
ビルビン酸カリウム	50 mM
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ	0.1 U/ml

上記の組成よりなる反応液3.0ml を分取し、37℃で約5分間予備加温する。これに血清0.1ml を添加した後、37℃で5分間反応させ、リン酸量を570nm の吸光度変化より比色定量した。また同一の血清を市販品(東洋紡製ダイヤカラー・IP)を用いて測定し、その相関を求めた。その結果は図6に示す相関図が得られ、その相関は

$$r=0.984 \quad (n=59)$$

$$Y=0.981X+0.07$$

であり、極めて良好なものであった。

#### 【0029】

【発明の効果】本発明では、熱安定性に優れたビルビン

酸デヒドロゲナーゼを使用することにより、優れた溶液安定性を有する分析用試薬、例えばリン酸測定用試薬を製造することができる。また溶存酸素の影響を受けないので、ドライ・ケミストリー、固定化酵素など、広範囲の測定系が可能となる。また本発明では更に上記のビルビン酸デヒドロゲナーゼ、TPP、ビルビン酸塩電子受容体、及びマグネシウムイオン、コバルトイオン、カルシウムイオン、ニッケルイオン、亜鉛イオンのうち少なくとも1種の金属イオンおよび必要によりFADからなる反応系をリン酸含有試料系と反応させることにより、良好に試料系中のリン酸を高濃度まで測定することが出来、またこの反応系中の電子受容体にニトロテトラゾリウムブルー(NTB)等のホルマザン系色素を共役させることにより、簡便かつ良好にリン酸を高濃度まで測定出来る。さらに本発明によれば、リン酸を遊離する系における基質、例えばATP、ピロリン酸、リン酸モノエステルなど、及びリン酸形成反応を触媒する酵素、例えばATPase、ピロホスファターゼ、ホスファターゼなどの測定にも利用することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のビルビン酸デヒドロゲナーゼの至適pHを示す。

【図2】本発明のビルビン酸デヒドロゲナーゼの安定pHを示す。

#### 【符号の説明】

図中、○—○は50mM酢酸緩衝液、●—●は50mM K-リン酸緩衝液、△—△は50mM Tris-HCl 緩衝液を示す。

【図3】本発明のビルビン酸デヒドロゲナーゼの至適温度を示す。

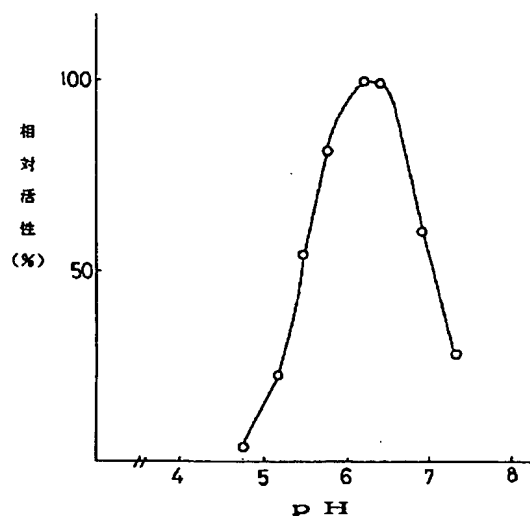
【図4】本発明のビルビン酸デヒドロゲナーゼの熱安定性を示す。

【図5】本発明のビルビン酸デヒドロゲナーゼを用いたリン酸の検量線を示す。

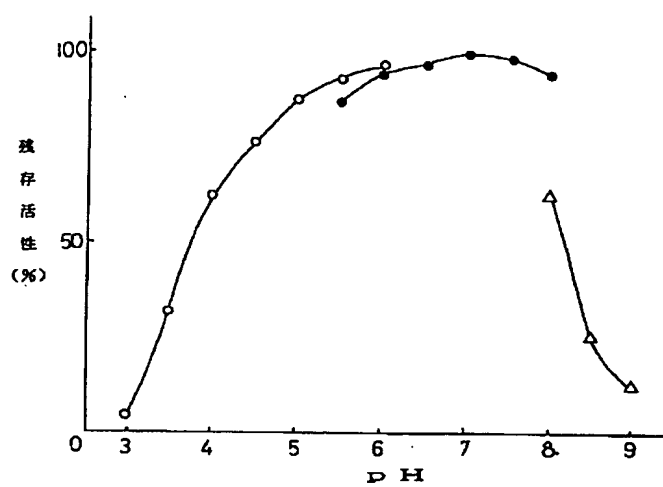
【図6】本発明のビルビン酸デヒドロゲナーゼを用いたATPの検量線を示す。

【図7】実施例2における市販品との相関図を示す。

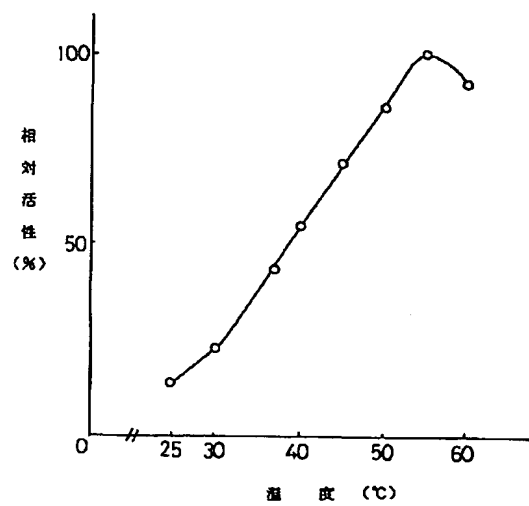
【図1】



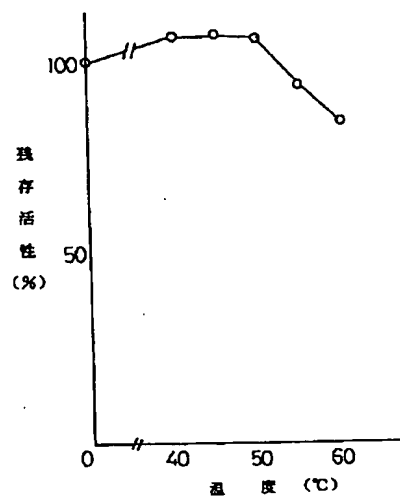
【図2】



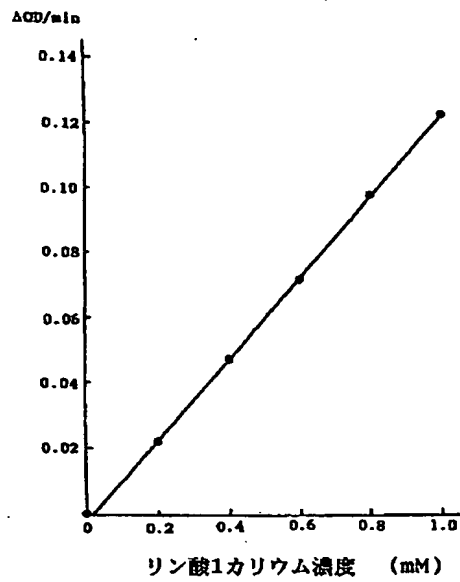
【図3】



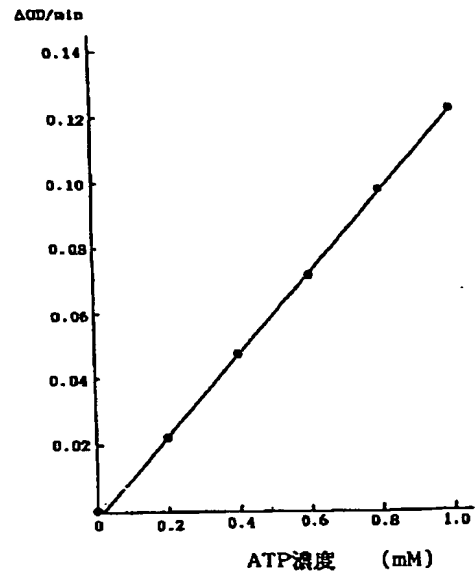
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

